

2/5/1 (Item 1 from file: 350)  
2569185 WPI Acc No: 80-87203C/49  
XRAM Acc No: C80-C87203

Modified asparaginase and uricase - substd. by triazinyl gp. to reduce antigenicity

Patent Assignee: (MIHA/) MIHAMA H

Number of Patents: 003

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week	
JP 55135590	A	801022	8049	(Basic)
JP 86042558	B	860922	8642	
JP 62055079	A	870310	8715	

Priority Data (CC.No.Date): JP 7941203 (790405): JP 8693855 (860000):

**Abstract (Basic):** Modified asparaginase and uricase having reduced antigenicity where amino gp. in L-asparaginase or uricase molecule is substd. partially with gp. of formula (I) (where R is water-soluble high molecular residue of mol. wt. over 2000). R is pref. O-substd. polyethylene glycol residue, esp. O-methoxy polyethylene glycol residue of mol. wt. over 5000. Pref. ca. 50% of amino gp. in asparaginase molecule in substd. with 2,4-bis-(O-methoxypolyethyleneglycol)-S-triazine-6-yl of mol. wt. 5000. Prodn. of modified asparaginase comprises treating L-asparaginase or uricase with 2,4-bis(O-substd.-polyethyleneglycol)-6-chloro-S-triazine. L-asparaginase may be used as antitumour drug for certain cells which require L-asparagin as necessary nutrient. Modified uricase can be administered to arthritis urica patients.

File Segment: CFI

Derwent Class: B04; D16;

Int Pat Class: A61K-037/54; C12N-009/82

Manual Codes (CFI/A-N): B04-B02C2; B04-B02C3; B12-D03; B12-G07; D05-A02

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* V800 F580 H521 H522 H523 H581 H582 H583 H584 H589 N000 P421 P631  
P633 P634 M720 M423 M902

Ring Index Numbers: 00212

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公告

⑪ 特 許 公 報 (B 2)

昭61-42558

⑫ Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 9/82  
// A 61 K 37/54

識別記号 庁内整理番号  
A D U 7421-4B  
7138-4C

⑬ 公告 昭和61年(1986)9月22日

発明の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 修飾アスパラギナーゼ

⑮ 特 願 昭54-41203

⑯ 公 開 昭55-135590

⑰ 出 願 昭54(1979)4月5日

⑱ 昭55(1980)10月22日

⑲ 発 明 者 稲 田 祐 二 横浜市西区老松町30番地2の401

⑳ 出 願 人 美 浜 久 春 東京都世田谷区梅丘2丁目23番36号

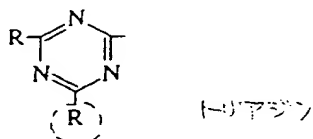
㉑ 審 査 官 森 田 ひ と り

1

2

㉒ 特許請求の範囲

1 L-アスパラギナーゼ分子中のアミノ基が式



(ここに、Rは分子量2000以上のO-メトキシポリエチレングリコール残基を示す。)

を有する基で部分的に置換された抗原性を低下又は消失させた修飾アスパラギナーゼ。

発明の詳細な説明

本発明は抗原性を低下又は消失させた修飾アスパラギナーゼに関し、医薬としての安全性を高めたものである。

L-アスパラギナーゼは分子量約13.4万で4つの同一のサブユニットよりなる蛋白質であり、L-アスパラギンをL-アスパラギン酸とアンモニアに加水分解する反応を触媒する酵素である。ある種の腫瘍細胞はL-アスパラギンを必須栄養源の1つとすることにより、この栄養源をL-アスパラギナーゼを用いて分解し、腫瘍細胞の増殖を抑えると共に死滅させる目的で同酵素は抗腫瘍剤として用いられている。

大腸菌およびその他の微生物より生産されたL-アスパラギナーゼはヒトにとって非自己であるため、同酵素の体内投与によつて免疫系を刺激し、多量の抗体を産生する。そのため腫瘍患者に同酵素を投与して一時的に病気がなおつた般患者が同病を再発した場合に、再度のアスパラギナー

ゼ投与は不可能であるため、その治療が著しくさまたげられ、過つて投与した場合にはアナフィラキシーショックを起し、生命に重大な危険を与える。

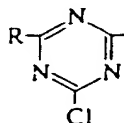
5 即ち、L-アスパラギナーゼ分子の表面にはヒトにとって非自己と認識される抗原決定部位が少なくとも7~8ヶ存在し、それぞれの部位は2~3個のアミノ酸残基によつて構成されていると考えられている。

10 L-アスパラギナーゼの抗原性を低下あるいは消失せることは、ヒトにとって非自己であつたL-アスパラギナーゼを自己に変換させることであり、連続投与ができなかつた従来のアスパラギナーゼ療法を更に発展させ、腫瘍患者への再投与を

15 可能にするための改良が望まれている。

本発明者は、先にL-アスパラギナーゼ分子中に存在するアミノ酸残基を、

式



(ここに、Rは分子量2000以上のO-メトキシポリエチレングリコール残基を示す)

を有する基で部分的に置換することによつて、酵素活性を保持しながら抗原性を著しく低下又は消失させることができることを見出し、特許出願した(特開昭54-119082参照)。

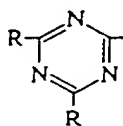
30 これら先の発明においては、L-アスパラギナ

ーゼの表面をヒゲ状の高分子残基で覆うことによつて、抗原抗体反応を阻止するものであつて、酵素活性を保持したまゝで抗原性を消失させることに特徴がある。しかしながら、抗原性を消失させるためには酵素活性も又かなり低下する欠点があつたため、なお改良する必要があつた。

本発明者は研究の結果、2本鎖の水溶性高分子残基を有するトリアジンをアスパラギナーゼに反応させることによつて、1本鎖の水溶性高分子残基を有するトリアジンを同酵素に反応させた場合 10 に比べ同酵素のアミノ酸残基の修飾数を減らすことができ、また酵素表面を水溶性高分子で覆う効果が增加すると共に、酵素活性の低下を抑制することに成功した。

即ち、本発明はL-アスパラギナーゼ分子中の 15 アミノ基が

式

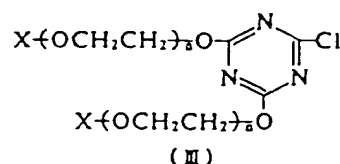
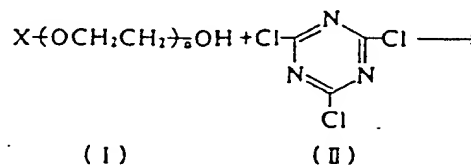


(ここに、Rは分子量2000以上のO-メトキシポリエチレングリコール残基を示す)

を有する基で部分的に置換された抗原性を低下又 25 は消失させた修飾アスパラギナーゼである。

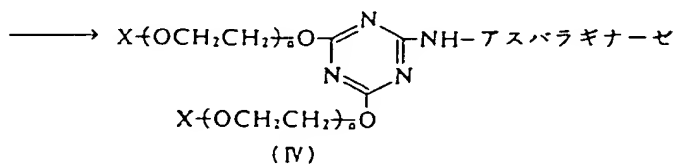
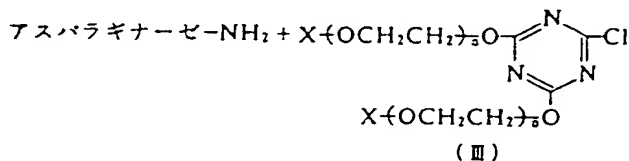
本発明の修飾アスパラギナーゼの製法の1例を示す。

・ 分子量2000以上のO-メトキシポリエチレングリコール (I) と 2・4・6-トリクロール-S-トリアジン (II) とを反応させることによつて、2・4-ビス (O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロール-S-トリアジン (III) が製造される。



(Xはメチル基を示す) 反応は塩基の存在下還流 20 温度で行なわれる。

次にpH10に保つたL-アスパラギナーゼ溶液に、2・4-ビス (O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロール-S-トリアジン (III) をアスパラギナーゼ分子中に存在するアミノ基当り1.5~15倍 (モル) を蛋白質の変性を起こさない条件下で反応させることによつて、アスパラギナーゼ分子中のアミノ基が部分的に置換された本発明修飾アスパラギナーゼ (IV) が得られる。



本発明の修飾アスパラギナーゼは、その分子量を測定すると、アスパラギナーゼの分子量13.4万と結合した化合物 (III) の分子量の合計に一致していることにより確認される。

本発明の修飾アスパラギナーゼについて、前記化合物 (III) の付加率は、未反応のアミノ基をトリニトロベンゼンスルホン酸を用いて測定する方法により行い、アスパラギナーゼ分子中の結合し

5

たアミノ基の数を測定した。酵素活性の測定は、  
 L-グルタミン酸-オキザロ酢酸トランスアミナ  
 ーゼを用い、リンゴ酸の生成に伴うNAD<sup>+</sup>の変  
 化量を分光学的に測定する方法（A法）およびア  
 スパラギン酸とヒドロキシアミン共存下における  
 同酵素によるアスパラギン酸ヒドロキサメートの  
 生成を塩化第二鉄により発色させる方法（B法）  
 により測定した。更に抗原性の測定は、ウサギを  
 L-アスパラギナーゼで免疫した抗血清を用い、  
 抗原-抗体反応により生ずる沈澱量を測定する方  
 法により行い、抗体との結合能（抗原性）を測定  
 した。

実施例の方法により製造された本発明の2本鎖  
 (PEG<sub>2</sub>)の修飾アスパラギナーゼ及び比較のため  
 1本鎖 (PEG<sub>1</sub>)のそれについて、酵素活性及び抗  
 体との結合能を測定した結果は次表のとおりであ  
 る。

PEG <sup>a)</sup> (MW)	モル比 <sup>b)</sup> PEG <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub>	結合した アミノ基 の数 <sup>c)</sup>	酵素活性		抗体と の結合 能
			A法	B法	
—	0	0	100	100	100
5000	3	20	37	32	89
"	5	46	23	25	86
"	10	48	21	21	76
"	12.5	50	13	21	57
"	15	52	8	15	0
5000 (PEG <sub>1</sub> /NH <sub>2</sub> ) <sup>10</sup>		73	0.9	7	0

a) O-メトキシポリエチレングリコールの分  
 子量

b) アスパラギナーゼ分子中のアミノ基に対  
 するPEG<sub>2</sub>のモル比

c) アスパラギナーゼ分子中のアミノ基 (92  
 個のうち、2,4-ビス (O-メトキシポリエチ  
 レングリコール)-S-トリアジン-6-イルが

6

結合したアミノ基の数

本発明のPEG<sub>2</sub>修飾アスパラギナーゼはPEG<sub>1</sub>修  
 飾アスパラギナーゼに比べて酵素活性を保持して  
 いながら、抗原性が完全に消失しているか著しく  
 低下しているので安全性が高い。更に加えて、ア  
 ミノ基が修飾をうけているので蛋白分解酵素によ  
 る分解に対し抵抗性が大きく、例えばトリプシン  
 を作用させても80%の活性が保持される特徴を有  
 する。

#### 10 参考例

10gの無水炭酸ソーダを含む100mlの無水ベン  
 ゼンに分子量5000のモノメトキシポリエチレング  
 リコール20gを溶解し、80°Cで30分間還流した  
 後、2・4・6-トリクロール-S-トリアジン  
 365mgを加え、1昼夜80°Cで還流下反応させた。  
 反応残留物を除去し、石油エーテル300mlを加え  
 て沈澱を生ぜしめ、沈澱を数回石油エーテルで洗  
 い、2・4-ビス (O-メトキシポリエチレングリ  
 コール)-6-クロール-S-トリアジンを製造  
 した。

#### 20 実施例 1

L-アスパラギナーゼ10mgを含む0.1Mほう酸  
 緩衝液 (pH10) 2mlに、上記により製造した2・  
 4-ビス (O-メトキシポリエチレングリコール)  
 25 -6-クロール-S-トリアジンを、アスパラギナ  
 ーゼ分子中のアミノ基に対し15倍モル比加え、37  
 °Cで1時間反応させた。常法により精製し、白色  
 粉末の修飾アスパラギナーゼを得た。このものの  
 分子量は60万であり、アミノ基の分析の結果、52  
 30 個が結合していたので、付加部分の分子量52×  
 5000×2≒52万とアスパラギナーゼの分子量13.4  
 万との合計値とはほぼ一致した。そして、このもの  
 は抗体との結合能は完全に消失しているが、酵素  
 活性はA法で8%、B法で15%保持していた。